

## Beszámoló

### Krónikus kalcium antagonistá kezelés hatása a szívizomra OTKA nyilvántartási szám: T 73160

A beszámoló készítésekor elsősorban a projekt megvalósítása során már publikált adatainkból és eredményeinkből levonható következtetéseinket részletezem, mintegy szintetizálva az egyes publikációk eredményeit. A konkrét adatok megtalálhatóak a közleményekben és a részjelentésekben.

A projekt célja az volt, hogy megvizsgáljuk, milyen hatással van a kalcium antagonistá krónikus adagolása a szívizom L-típusú kalcium-csatornáinak molekuláris biológiai és elektrofiziológiai sajátosságaira. A rágcsálókön végzett tájékozódó kísérleteink eredményei arra utaltak, a szívizomsejtek a kalcium homeosztázis szabályozása során nem csak az egyes ioncsatornákon átfolyó ionáramot regulálják, hanem hosszú távon a felszíni membránban helyet foglaló, működő ioncsatornák számát is módosítják.

Immunbiokémiai ill. immunhisztokémiai módszerekkel, voltage-clamp technikákkal tanulmányoztuk kalcium antagonistá krónikus adagolásának hatásait egészséges kutya kamrai preparátumokon. A kísérleteket kutya szívizomsejteken végeztük, mert ezen preparátumok elektrofiziológiai paraméterei nagymértékben hasonlítanak a humán szívizoméhoz, szemben a rágcsálók szívizmával.

1. Munkánk során kétféle kalcium antagonistát használtunk, a verapamilt és a nifedipint. A verapamil állandó vérszintjét, a kezelés során, a kísérleti állatok hasüregébe helyezett ozmotikus pumpa biztosította, amelyből egyenletesen és folyamatosan áramlik ki a szer. A nifedipin adagolása egyszerűbb, a kísérleti állatokat napi 1 tbl/nap Adalat GITS 60 retard filmtablettával kezeltük 4 héten keresztül, amiből szintén folyamatosan szívódik fel a nifedipin. Ez esetben a serum nifedipin koncentrációját nagynyomású folyadékkromatográffal folyamatosan monitoroztuk. Megállapítottuk, hogy a nifedipin vérszintje nem változott szignifikáns mértékben a 4 hetes kezelés során, a kezelés megkezdése után 1 héttel  $30,3 \pm 5,9$  ng/ml-t mértünk, a 4 hetes kezelés végén a serum nifedipin koncentrációja  $37,3 \pm 9,23$  ng/ml volt.

A verapamil a kalciumcsatornákon kívül a szívizomsejtek nátrium és káliumcsatornáinak működését is befolyásolja. A nifedipin, a verapamilnál szelektívebb kalcium antagonistá, viszont a nifedipin esetében számolnunk kellett a szer vasculáris hatásaival is. Ennek megfelelően a kísérleti állatok EKG paramétereit és vérnyomás értékeit folyamatosan ellenőriztük. Megállapítottuk, hogy az alkalmazott kalcium antagonisták egyike sem okozott szignifikáns eltérést a kutyák EKG paramétereiben. A nifedipin kezelt kutyák esetén mind a systolés, mind a diastolés nyomásértékek szignifikáns csökkenését tapasztaltuk. Az izolált szívizomsejtek kapacitásának mérésével megállapítottuk, hogy sem a verapamil sem pedig a nifedipin kezelés nem változtatta meg szignifikánsan a szívizomsejtek méretét.

2. A kalciumáram mérése során megállapítottuk, hogy a nifedipin kezelést követően (4 hét) a kalciumáram ( $I_{Ca-L}$ ) amplitúdója a bal kamra mindhárom rétegében szignifikánsan nagyobbak bizonyult, átlagosan  $48 \pm 13\%$ -kal, a kontroll állatokéhoz képest. A krónikus kalcium antagonistá kezelés a pozitívabb

membránpotenciálok irányába mozdította a kalciumáram steady-state inaktivációjának feszültségfüggését a szívizom mindhárom rétegében. Ugyanakkor, az összegyűjtött szövetmintákból meghatározva a kalcium csatorna alfa alegységének ( $Ca_v1.2$ ) mennyiségét azt tapasztaltuk, hogy az optikai denzitás értékek szignifikánsan kisebbek voltak a krónikusan kalcium antagonistával kezelt kutyák epi- és endo-cardiális rétegeiben, mint a kezeletlen kutyákból származó mintákban. A midmyocardiumból származó minták esetében viszont nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a normalizált optikai denzitás értékekben a kezelt és kezeletlen csoportok között. Az immunfluoreszens vizsgálatokkal is hasonló eredményre jutottunk, nevezetesen, az L-típusú kalciumcsatorna elleni antitesttel történő jelölés után, a nifedipin kezelt állatok szívizomsejtjeinek felszíni membránjában kisebb mértékű fluoreszcencia intenzitást detektáltunk, mint a kezeletlen állatokban.

2. A tapasztalt  $I_{Ca-L}$  növekedés alapján azt vártuk, hogy nőni fog az az akciós potenciálok időtartama ugyanúgy, mint ahogyan azt a BAY K 8644 kezelést követően tapasztaltuk. Ezzel szemben, az akciós potenciál paramétereinek analízise alapján megállapítottuk, hogy az  $I_{Ca-L}$  amplitúdó növekedés ellenére, a krónikus nifedipin kezelés nem változtatta meg szignifikáns mértékben sem a kutya szívizomsejtek akciós potenciáljának az időtartamát ( $APD_{50}$  és  $APD_{90}$ ) sem pedig ezen paraméterek diasztolés intervallum függését.

A BAY K 8644 kezelt kutya kamrai preparátumokon azt tapasztaltuk, hogy az APD növelése kifejezettebb volt az alacsonyabb ingerlési frekvenciákon. A BAY K 8644-en kívül teszteltünk további akciós potenciál időtartamot növelő és csökkentő molekulát is (Veratrin,  $BaCl_2$ , dofetilid) és megállapítottuk, hogy valamennyi molekula hatása fordítottan arányos az ingerlő impulzusok frekvenciájával. Megállapítottuk továbbá azt is, hogy az APD időtartamának változása annál nagyobb mértékű, minél hosszabb a kiindulási APD érték. Ebből arra következtettünk, hogy a különböző molekulák esetén megfigyelt fordított frekvenciafüggő hatás a sejtmembrán intrinszc sajátsága.

Az akciós potenciál mérések alapján feltételeztük, hogy a kalciumáram növekedés nyújtó hatását, a szívizom repolarizációjában résztvevő ionáramok kompenzálhatják. Ennek bizonyítására megvizsgáltuk a krónikus kalcium antagonistá kezelés hatását káliumáramokra is. Megállapítottuk, hogy 4 hét nifedipin kezelés nem változtatta meg szignifikánsan a káliumáramok ( $I_{to}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{K1}$ ) amplitúdóját és kinetikai paramétereit.

A kontroll szívizomsejtekre jellemző, hogy a beta-adrenerg agonista kezelés hatására megnő mind az L-típusú kalciumáram mind a késői káliumáram lassú komponensének ( $I_{Ks}$ ) az amplitúdója. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy, a nem-specifikus beta-adrenerg agonista izoproterenol, szignifikánsan növeli a késői káliumáram gyors komponensének ( $I_{Kr}$ ) az amplitúdóját is kutya szívizmon. Az izoproterenol  $I_{Kr}$  és  $I_{Ks}$  növelő hatása kivédhető volt szelektív  $\beta_1$  receptor blokkoló, vagy PKA inhibitorok alkalmazásával. Az EPAC útvonal gátlása, vagy a PKC inhibitorok alkalmazása (chelerythrin, bisindolylmaleimid I) viszont hatástalannak bizonyultak. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy a beta-adrenerg stimuláció elsősorban a PKA jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolja a vizsgált ioncsatornákat. A krónikus kalcium antagonistá kezelést követően viszont az izoproterenol nem tudta tovább növelni az  $I_{Ca-L}$ -t.

3. Az akciós potenciál paramétereinek mérésével párhuzamosan, fluorescens festékek alkalmazásával mértük az intracelluláris kalcium koncentráció változásait is. Bár az intracelluláris kalciumtranziensek amplitúdója változatlan maradt, szignifikánsan csökkent a nyugalmi fluoreszcencia mértéke, ami csökkent nyugalmi kalcium szintre utal. A kalcium eltávolító mechanizmusok aktivitásának jellemzéséhez a kalcium tranziensek leszálló szárát monoexponenciális függvénnyel illesztettük. Megállapítottuk, hogy a kalcium-tranziensek relaxációja szignifikánsan gyorsult a nifedipin kezelés hatására, ugyanakkor, a krónikus kalcium antagonistá kezeléssel nem változtatta meg a szívműködő sejtek kontraktilis filamentumainak kalcium érzékenységét.

A kalcium homeosztázis további fontos szereplője a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  cseremechanizmus (NCX). Az NCX áram inward és outward komponensét, mint nikkellel szenzitív áramot detektáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a nifedipin kezelés az NCX outward komponensét jelentősen nem változtatta meg, ezzel szemben az áram inward komponensében szignifikáns változás következett be, a denzitás  $-0,39 \pm 0,20$  pA/pF-ról  $-0,70 \pm 0,31$  pA/pF-ra változott. Ezen utóbbi mechanizmus magyarázatot adhat a kalciumtranziensek relaxációjának gyorsulására

Eredményeink fontosak lehetnek azokban az esetekben, amikor a hosszan tartó IV-es típusú antiaritmiás kezelésben részesülők terápiája módosítására szorul, mivel a kalcium-csatorna antagonistá elhagyásával a hirtelen megnövekedő kalciumáram-denitász, illetve kalciumion-koncentráció aritmiát válthat ki.

A krónikus kalcium antagonistá kezeléssel nemcsak a szívműködő, hanem az ér simaizom sejtekre is hat. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk, hogy a kezelt állatok szisztolés és diasztolés vérnyomás értékei folyamatosan csökkennek négyhetes kezeléssel során. Bár a jelenlegi OTKA projekt hivatalosan lezárult, de a kísérleteket tovább folytatjuk, a projekt során felvetődött újabb kérdések tisztázására, valamint a kísérleteket szeretnénk kiterjeszteni az ér simaizomsejtek irányába is.